Über Clupein

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
einer Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Friedrich Dölp

aus Bensheim a. d. B.

im Mai 1939

Satz und Druck: Albrecht Beck, Frankfurt-Süd, Schweizerstraße 50

Referent: Professor Dr. Kurt Felix.

Korreferent: Professor Dr. Georg Hahn.

Tag der mündlichen Prüfung:

10. Juli 1939.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

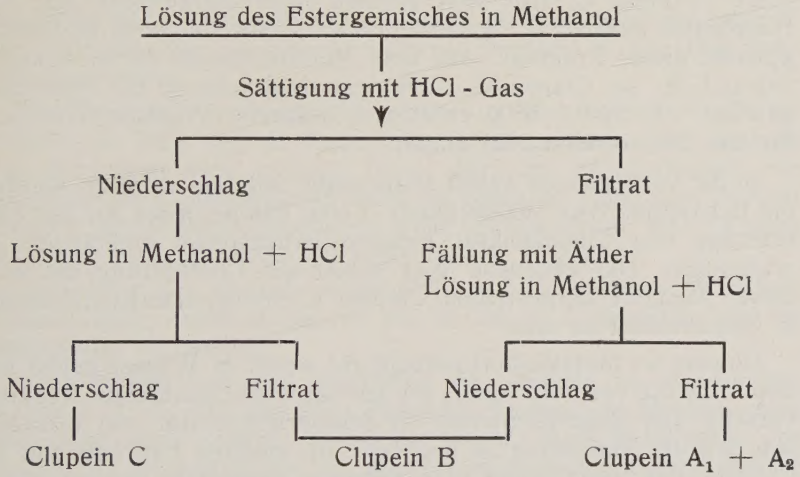
Allgemeiner Teil.

In den Spermatozoen der Fische wurden Eiweißkörper gefunden, die ein relativ kleines Molekulargewicht besitzen. Außerdem ist die Anzahl der sie aufbauenden Aminosäuren gering. Diese Eiweißkörper, Protamine genannt, und besonders das Clupein, welches als Protamin des Heringspermas zu dieser sowohl chemisch als auch biologisch interessanten Gruppe einfachster Eiweißkörper gehört, haben schon frühzeitig Interesse erweckt. Die Protamine sind wesentliche Bausteine des Kerns der Spermatozoen und damit wohl auch Träger wichtiger biologischer Funktionen. Ihr Hauptmerkmal ist außer geringem Molekulargewicht und wenigen Aminosäuren der hohe Gehalt an basischen Aminosäuren, besonders Arginin. Dieser hohe Gehalt an Arginin, beim Clupein beträgt der Argininstickstoff etwa 88 % vom Gesamtstickstoff, verleiht den Protaminen ausgesprochen basischen Charakter. Man teilt die Protamine nach ihrem Gehalt an verschiedenen Diaminosäuren in drei Gruppen ein. Die Monoprotamine enthalten nur Arginin, die Diprotamine außerdem noch Histidin oder Lysin und die Triprotamine alle drei Hexonbasen. Das Clupein gehört zu den Monoprotaminen. Man findet die Protamine in den Köpfen der Spermatozoen. Sie kommen dort salzartig an Nucleinsäuren gebunden vor. Nach Untersuchungen von Kossel und Weiss[1] ergab sich, daß die Protamine im Laufe der Spermatogenese aus Proteinen gebildet werden. Das Analogon bei den höheren Tieren bilden die Histone.

Das am einfachsten zu beschaffende und das am besten untersuchte Protamin ist das Clupein. Zur Darstellung des Nucleoprotamins wurden die ausgereiften Heringtestikeln in der Fleischhackmaschine zerkleinert, in destilliertem Wasser suspendiert und dann koliert. Aus dem Filtrat wurde das Nucleoprotamin durch die eben nötige Menge Eisessig gefällt. Es wurde turbiniert und dann filtriert. Der Niederschlag wurde noch einmal mit 1 %iger Essigsäure, darauf mit reinem Wasser aufgerührt und filtriert. Das so erhaltene Präparat wurde in Aceton suspendiert, filtriert, mit Äther gewaschen und an der Luft getrocknet. Im Durchschnitt wurden aus 3000 g Testikeln etwa 600 g eines weißen, gut pulverisierbaren Produktes

erhalten. Die Isolierung des Clupeins erfolgte über das Pikrat. Zu diesem Zwecke wurden die getrockneten und gepulverten Spermatozoenköpfe in Wasser suspendiert und 12 — 14 Stunden zur Quellung stehen gelassen. Nun wurde unter starkem Turbinieren soviel 2 n NaOH zugegeben, bis die Lösung schwach alkalisch war. Nach 30 Minuten wurde ebenfalls unter starkem Rühren soviel 50%ige Schwefelsäure zugegeben, bis die Lösung einer 1%igen Schwefelsäure entsprach. Dadurch wurde erreicht, daß bereits beim dritten Auszug mit 1%iger Schwefelsäure alles Clupein in Lösung gegangen war. Die schwefelsaure Lösung wurde 30 Minuten turbiniert und dann zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde filtriert und der abzentrifugierte Rückstand noch zweimal mit 1%iger Schwefelsäure ausgezogen. Die Filtrate wurden mit einer warmen Na-Pikratlösung versetzt, bis kein weiteres Clupeinpikrat mehr ausfiel. Das flockige Pikrat setzt sich innerhalb weniger Stunden gut ab und wurde dreimal mit Leitungswasser dekantiert. Das so erhaltene Clupeinpikrat ist mehr oder minder mit Pikraten von Purinbasen verunreinigt. Um diese zu entfernen, wurde das noch feuchte rohe Clupeinpikrat in der Reibschale mit soviel n/20 NaOH verrieben, bis die überstehende Flüssigkeit gegen Lackmus deutlich alkalisch war. Es wurde sofort abgesaugt und noch zweimal mit derselben Menge Natronlauge digeriert. Das Pikrat wurde hierauf noch mit Wasser, n/20 Salzsäure und wiederum mit Wasser gewaschen. Das an der Luft getrocknete Präparat war hellgelb und gut pulverisierbar. Aus 1000 g des angewandten Nucleoprotamins wurden im Durchschnitt 250 g des gereinigten und getrockneten Clupeinpikrates gewonnen. Das getrocknete Pikrat wurde in wasserfreiem Methanol suspendiert und unter starkem Rühren und guter Eiskühlung, bei Ausschluß jeglicher Luftfeuchtigkeit, getrocknetes Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet. Hierbei ging die Pikrinsäure und ein Teil des Clupeins in Lösung. Der Rückstand wurde abgesaugt und unter gelindem Erwärmen in absolutem Methanol gelöst. Hierbei blieb eine schmierige, spezifisch schwere Masse übrig, von der abfiltriert wurde. Die methylalkoholische Lösung wurde in absoluten und mit Salzsäuregas gesättigten Äther unter gutem Rühren eingegossen. Hierbei fiel ein weißes Pulver aus. Diese Umfällung wurde noch einmal wiederholt und so ein schneeweißes, lockeres Pulver erhalten. Der bei der Behandlung mit Salzsäuregas in Lösung gegangene Anteil des Clupeinpikrates wurde ebenfalls mit Äther gefällt und auf die gleiche Weise gereinigt. Nach diesem Verfahren erhält man die salzsauren Salze der Clupeinester von verschiedener Löslichkeit in salzsaurem Methylalkohol.

Nach K. Felix und K. Dirr[2] werden die leicht löslichen Clupeine mit A, die schwerer löslichen mit B und die sehr schwer löslichen mit C bezeichnet. Es handelt sich hierbei um gleichartige Komponenten verschiedenen Molekulargewichtes. Die Fraktionierung dieser Komponenten wird nach K. Felix und K. Dirr nach folgendem Schema durchgeführt.



Waldschmidt-Leitz[3] hat darauf hingewiesen, daß bei der Veresterung von Clupeinpikrat ein Zerfall des Moleküls eintritt. Er begründet seine Ansicht durch Bestimmung des Quotienten: Gesamtstickstoff zu Aminostickstoff, welcher beim Clupeinsulfat 104 beträgt. Nach der Veresterung sinkt dieser Quotient auf 36,4. Diese Tatsache läßt allerdings ohne Zweifel erkennen, daß hierbei ein Zerfall des Moleküls eingetreten ist. Dieser Zerfall führt aber nicht zu sehr kleinen Bruchstücken, sondern zu schon nur in einem anderen quantitativen Verhältnis vorkommenden Komponenten. K. Felix und K. Dirr haben, wie bereits erwähnt, diese Komponenten aufgefunden und hierfür die Bezeichnung A_1, A_2 und B eingeführt. Für die mit C bezeichnete Komponente wurde, wie im praktischen Teil gezeigt wird, ein Quotient gefunden, der dem von Waldschmidt - Leitz geforderten entspricht.

Inzwischen war durch Arbeiten von H. Schuberth[4], ferner von K. Felix und A. Mager[5] die Art der Veresterung etwas abgeändert worden. Während K. Felix und K. Dirr[2] das Clupeinpikrat in gewöhnlichem, nicht getrocknetem Methanol aufschwemm-

ten, die Veresterung mit nicht getrocknetem Salzsäuregas durchführten, ohne Eiskühlung arbeiteten, wobei die Temperatur bis + 30° anstieg, wählten die oben genannten Verfasser wesentlich mildere Bedingungen. Sie verwandten absolutes Methanol, veresterten bei 0° bis + 2° und trockneten das Salzsäuregas. Es ergab sich die verblüffende Tatsache, daß die vorher in geringer Menge anfallende Fraktion C, also vom größten Molekulargewicht, nun den Hauptanteil ausmachte. Außerdem überraschte das hohe Molekulargewicht dieser Fraktion. Aus dem Methoxylgehalt dieser Fraktion ließ sich für das Clupein C - Methylesterhydrochlorid ein Molekulargewicht von 5000 — 5500 errechnen, während Waldschmidt - Leitz für das Clupeinsulfat 2021 angibt.

In der vorliegenden Arbeit sollte unter anderem versucht werden, die Behauptung von Waldschmidt - Leitz, daß bei jeder Art der Veresterung von Clupeinpikrat kleinere Bruchstücke entständen, zu widerlegen. Der gegebene Weg schien die Überführung des nach dieser Methode hergestellten Clupein C - Methylesterhydrochlorids in Clupeinsulfat zu sein.

Clupein C - Methylesterhydrochlorid wurde in Wasser gelöst und durch Zusatz von n/10 NaOH bis zur schwach alkalischen Reaktion verseift. Ein längeres Stehen bei Zimmertemperatur war erforderlich, um die Verseifung zu beenden. Im anderen Fall entstand ein Produkt, das, anscheinend noch teilweise methyliert, sich aus Wasser nicht umscheiden ließ. Dann wurde nach der üblichen Methode das Clupeinsulfat, als ein in verdünntem Alkohol schwer lösliches Öl, mit verdünnter Schwefelsäure gefällt. Das so gewonnene Sulfat wurde, analog der Darstellung aus Pikrat, aus konzentriert wässriger Lösung bis zur Konstanz des Quotienten umgefällt. Das so dargestellte Produkt war rein weiß, und das Verhältnis Gesamtstickstoff zu Aminostickstoff ergab sich zu der von Waldschmidt - Leitz geforderten Zahl. Daraus ergibt sich die Tatsache, daß Waldschmidt-Leitz, wenn er behauptet, daß bei jeder Art der Veresterung eine vollständige Spaltung in kleinere Bruchstücke einträte, wohl im Unrecht ist. Mit dieser Beweisführung kann auch der Hinweis, daß bei der Veresterung von Clupeinpikrat einzelne entstandene kleinere Bruchstücke wieder zu einem Eiweißkörper kondensiert würden, der mit dem ursprünglich vorhandenen keineswegs identisch, vielleicht noch ein größeres Molekulargewicht besitze, wohl als widerlegt gelten.

Man kann nach diesen Versuchen behaupten, daß die Veresterung von Clupeinpikrat nach dieser schonenden Methode ein ideales Verfahren darstellt, um das Clupein von der Pikrinsäure zu befreien.

Man muß vielleicht mit in Kauf nehmen, daß die Veresterung nicht vollständig ist.

Über die Konstitution des Clupeins liegen verschiedene Arbeiten vor. Kossel[6] isolierte als erster folgende Aminosäuren:

1. Arginin, 2. Serin, 3. Prolin, 4. Alanin und 5. eine nicht näher bekannte Aminovaleriansäure. K. Felix, K. Inouye u. K. Dirr[7] gelang aus partiell hydrolysiertem Clupein die Isolierung eines Arginyl-Oxyprolinpeptides, so daß als weiterer Baustein 6. das Oxyprolin gefunden wurde.

Die Existenz von Oxyprolin wurde von Waldschmidt - Leitz bezweifelt, K. Felix und A. Mager[5] isolierten es nach einer Methode von Bergmann noch einmal. Damit darf das Vorhandensein von Oxyprolin im Clupeinmolekül wohl als gesichert angesehen werden. Weitere Aminosäuren sind noch nicht nachgewiesen, ihre Existenz ist jedoch wahrscheinlich (K. Felix und A. Mager[5]).

Es erhebt sich nun die weitere Frage: In welchem Verhältnis kommen diese Aminosäuren vor und in welcher Reihenfolge sind sie miteinander verbunden?

Nach Kossel[6] ist das Verhältnis von Arginin zu Monoaminosäuren 2 : 1, so daß auf zwei Moleküle Arginin ein Molekül einer Monoaminosäure kommt. Kossel hat ferner, durch Einwirkung von verdünnten Mineralsäuren, aus dem Hydrolysat ein Dipeptid isoliert, welches nur aus Arginin besteht, also Arginyl-Arginin darstellt. Er konnte es jedoch nur als öliges Pikrat fassen. Die Kristallisation von Arginyl-Arginin gelang zum erstenmal K. Felix und K. Dirr[8]. Durch die Isolierung von Arginyl-Arginin ergab sich, daß mindestens zwei Arginin-Moleküle nebeneinander stehen müssen, und daß nicht Arginin- und Monoaminosäuremolekül einander abwechseln. Ferner wurde von K. Felix und K. Dirr[2] festgestellt, daß das Clupeinmolekül eine freie, veresterbare Carboxylgruppe besitzt. Von E. Waldschmidt - Leitz[3] wurde durch Verdauung mit Protaminase, einem hierfür spezifischen Ferment aus Schweinepankreas, festgestellt, daß diese endständige Carboxylgruppe einem Argininmolekül angehört. Weitere Bruchstücke wurden von K. Felix, K. Inouye und K. Dirr[7], ferner von K. Felix, K. Dirr und R. Hirohata[9] isoliert. Diesen Autoren gelang es, aus Hydrolysaten des Clupeins mit verdünnten Mineralsäuren und mit Trypsinkinase als krist. Pikrate oder Pikrolonate folgende Dipeptide zu isolieren: Arginin mit Alanin, mit Serin und mit Valin — die Konstitution konnte aus Mangel an Material nicht festgestellt werden — ferner ein Arginyl-Oxyprolin und ein Tetrapeptid, welches nur aus Argininmolekülen be-

stand. Nicht sicher war der Gehalt an den einzelnen Aminosäuren. K. Felix und A. Mager [5] haben diese, soweit sie sich ermitteln ließen, bestimmt. Sie kommen dabei zu folgenden Ergebnissen:

Das Clupein enthält 22 Moleküle Arginin und 11 Moleküle Monoaminosäure. Vom Alanin und Serin sind je 2, vom Prolin 3 und vom Oxyprolin 1 Molekül vorhanden. Für das Valin bezw. noch unbekannte Bausteine bleiben weitere 3 Moleküle übrig. Nach dieser Zusammensetzung ergibt sich für das freie Clupein ein Molekulargewicht von 4470 und für das Methylesterhydrochlorid von 5340, nach den für den Methoxylgehalt angeführten Zahlen beträgt es 4770 bis 5070, bei der quantitativen Bestimmung von Alanin 5300. Sie stellten also folgende Formel auf:

HN-P-AA-AA-V-S-AA-AA-OP-V-AA-AA-P-
Al-AA-AA-P-S-AA-AA-V-Al-AACOOH.

Es bedeuten hierin: AA = Arginylarginin, P = Prolin, V = Valin, S = Serin, OP = Oxyprolin, Al = Alanin.

Diese Formel wird aus folgenden Tatsachen gefolgert:

1. Die quantitativen Bestimmungen von Methoxyl und Alanin stimmen mit den geforderten überein. Die Molekülgröße stimmt überein mit der von K. E. Rasmussen und Linderström-Lang [10] ermittelten.

2. Bei der partiellen Hydrolyse mit Salzsäure wurde, wie schon erwähnt, ein Tetrapeptid isoliert, welches nur aus Argininmolekülen besteht. Diese Tatsache läßt sich nur so erklären, daß im Clupeinmolekül stets zwei Clupeone (Tripeptide aus Arginyl-Arginin und Monoaminosäuren, wobei die Monoaminosäuren einmal am Carboxyl- und das andere Mal am Aminoende des Arginyl-Arginins stehen) wechselweise mit den Arginylenden aneinander gefügt sind.

3. Das Carboxylende der Peptidkette wird, wie schon erwähnt, von einem Arginyl-Arginin-Rest gebildet, während das Aminoende nach E. K. Rasmussen und K. Linderström-Lang [10] von der Iminogruppe eines Prolinrestes gebildet wird.

Diese Formel, welche sich auf Analysen und kristallisierten Bruchstücken, welche bei partiellem Abbau durch Fermente und durch Säuren gewonnen worden waren, aufbaut, weicht von der ab, die E. Waldschmidt-Leitz und E. Kofranyi [11] aufgestellt haben. Sie wiederholen im wesentlichen die alte Formel von Kossel und begründen sie mit einer enzymatischen Analyse. Sie haben keinerlei Spaltprodukte isoliert, mit denen die Schlüsse aus den Titrationen hätten belegt werden können. Trypsin soll im Clupein jeweils die

Bindung zwischen zwei Argininresten lösen. Die Isolierung von Triarginyl-Arginin wird mit der Erklärung abgetan, daß bei der verschiedenartigen Isolierung des Clupeins ein abweichender Aufbau zu erwarten sei. Deshalb wurde, nachdem die Identität des direkt aus dem Pikrat erhaltenen Clupeinsulfates mit dem durch Überführung von Clupein C - Methylesterhydrochlorid in das Sulfat festgestellt war, die Verdauung des Clupeins wiederholt. Diesmal wurde das Clupein C, während K. Felix und K. Dirr [9]) Clupein B verwendeten, mit aktiviertem Trypsin verdaut. Das zur Verdauung benutzte Trypsin wurde nach einem Verfahren von E. Waldschmidt-Leitz [12]) dargestellt. Der Spaltungsgrad war ähnlich dem der Verdauung von Clupeinsulfat. Bei der Isolierung der Spaltprodukte wurde nur auf ein einziges Spaltstück, nämlich Arginyl - Arginin, Wert gelegt. Als sehr vorteilhaft erwies sich die Tatsache, daß Arginyl-Arginin-Dipikrat in warmem Wasser gut löslich ist, während das Di-Flavianat etwa zehnmal schwerer löslich ist als Arginin-Flavianat. Alle schwer löslichen Pikrate wurden daher mit fester Pikrinsäure ausgefällt, ausgekocht und aus der ausgeätherten Lösung das Arginyl-Arginin als Di-Flavianat ausgefällt. Dieses wurde aus heißem Wasser umkristallisiert und als ein in 50%igem Alkohol schwer lösliches Dipikrat identifiziert. Die Methode erwies sich als sehr bequem und quantitativ. Zahlenmäßig wurde aus einem Mol Clupein C - Methylesterhydrochlorid bei einem zugrunde gelegten Molekulargewicht von 5340 ein Mol Arginyl-Arginin abgespalten.

Bei der Verdauung von Clupean konnte Arginyl-Arginin nicht erhalten werden. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß die beiden endständigen Arginine bei der Trypsinverdauung als Arginyl-Arginin abgespalten werden. Außerdem spricht für diese Vermutung, daß Monoaminosäuren, sofern sie leicht lösliche Pikrate bilden, im Verdauungsgemisch nicht nachgewiesen werden konnten.

Bei der Verdauung von Clupeinsulfat mit Protaminase erhielt Waldschmidt - Leitz [3]) einen Gesamtzuwachs an freiem Aminostickstoff, der einer Abspaltung von 11,37 mg Arginin für 0,1 g Clupein entsprechen würde. Bei der Nachprüfung wurden ganz entsprechend 10,4 mg festgestellt.

Bei der Verdauung von Clupein C - Methylesterhydrochlorid wurde mit Hilfe der Formoltitration eine ganz ähnliche Zahl, nämlich 10,8 mg Arginin für 0,1 g ermittelt. Bei der quantitativen Erfassung des Arginins wurden jedoch nur 6,56 mg gefunden. Vielleicht spricht diese Tatsache dafür, daß bei der Verdauung von Clupein mit Protaminase außer der Abspaltung von 2 Mol Arginin noch eine weitere,

noch nicht erfaßte Reaktion stattfindet. Bemerkenswert ist ebenfalls, daß das isolierte Arginin fast theoretisch dem durch Abspaltung vom Ester geforderten entspricht, wenn man das von Felix und Mager geforderte Molekulargewicht von 5340 in Betracht zieht.

Experimenteller Teil.

I. Darstellung der Clupeinpräparate.

1. Darstellung des Nucleoprotamins.

Zur Darstellung des Nucleoprotamins wurden 3000 g ausgereifter Heringtestikeln in der Fleischhackmaschine zerkleinert und in 12 l Wasser suspendiert. Die Suspension wurde 30 Minuten lang kräftig turbiniert und schließlich durch eine doppelte Lage von Verbandmull koliert. Aus dem Filtrat wurde das Nucleoprotamin mit 300 ccm Eisessig gefällt. Hierauf wurde nochmals 30 Minuten lang turbiniert und dann nach kurzem Absetzen durch Faltenfilter filtriert. Der Niederschlag wurde nochmals in 12 Liter 1%iger Essigsäure suspendiert, turbiniert und nochmals filtriert. Das noch feuchte Nucleoprotamin wurde in 6 Liter Aceton suspendiert, auf der Nutsche abgesaugt und noch zweimal mit Äther gewaschen. Nach dem Trocknen im Vacuumexsiccator wurde ein fast weißes Präparat erhalten.

Ausbeute: etwa 600 g = 20% der angewandten Testikeln.

2. Darstellung von Clupeinpikrat.

1000 g der getrockneten und gepulverten Spermatozoenköpfe wurden über Nacht in 15 Liter Wasser eingeweicht und am nächsten Morgen in demselben Topf mit 2n NaOH alkalisch gestellt und eine halbe Stunde turbiniert. Hierauf mit 20%iger Schwefelsäure versetzt, so daß die Lösung etwa 1% an Schwefelsäure enthielt. Die schwefelsaure Lösung wurde 30 Minuten turbiniert, dann abzentrifugiert und filtriert. Der Rückstand wurde noch dreimal mit 1%iger Schwefelsäure extrahiert. Die Lösungen, die fast alles Clupein als Sulfat enthielten, wurden mit einer heiß gesättigten Lösung von Natriumpikrat (100 g Pikrinsäure wurden in 500 ccm Wasser aufgeschlämmt und 40 ccm 32%ige Natronlauge zugegeben, hierauf wurde erhitzt bis die Pikrinsäure in Lösung gegangen war) versetzt, bis ein erneuter Zusatz keinen Niederschlag mehr ergab. Der Niederschlag wurde dreimal dekantiert, auf der Nutsche abgesaugt und mit Wasser gut nachgewaschen. Das Pikrat wurde zur Ent-

fernung der Purine in der Reibschale mit n/20 NaOH bei deutlich alkalischer Reaktion gut zerrieben, abgesaugt und diese Prozedur noch zweimal wiederholt. Der Niederschlag wurde hierauf mit Wasser, zweimal mit n/20 HCl und wiederum zweimal mit Wasser gewaschen. So wurde ein hellgelber Niederschlag erhalten, der auf Filtrierpapier an der Luft getrocknet wurde.

Ausbeute: im Durchschnitt 250 g.

3. Darstellung von Clupein C - Methylesterhydrochlorid.

100 g des getrockneten und gepulverten Clupeinpikrates wurden in 1500 ccm absolutem Methylalkohol aufgeschlämmt und unter guter Eiskühlung (0° bis + 2°) und Rührung getrocknetes Salzsäuregas eingeleitet, bis ein mit der Flüssigkeit benetzter Glasstab an der Luft eben rauchte. Nach kurzem Stehen wurde auf einer Glasfilternutsche abgesaugt und der Niederschlag sofort wieder in absolutem Methanol unter geringem Erwärmen gelöst. Beim Erkalten fiel eine zähe, sehr schwere Schmiere aus, von der abfiltriert wurde. Nun wurde die methylalkoholische Lösung in das 2½fache Volumen mit Chlorcalcium getrockneten und mit Salssäuregas gesättigten Äther unter gutem Rühren eintropfen lassen. Diese Fällung wurde noch einmal wiederholt, wodurch ein vollkommen weißer Niederschlag erhalten wurde, der auf der Glasfilternutsche abgenutscht, mit getrocknetem Äther nachgewaschen und sofort im Vacuumexsiccator über Chlorcalcium getrocknet wurde.

Ausbeute: 25 — 30 g.

Analyse: Gesamt - N = 23,77%,
Amino - N = 0,221%.

4. Darstellung von rohem Clupeinsulfat.

Noch feuchtes Clupeinpikrat wurde mit einer Mischung von 1 Vol. Aceton und 3 Vol. Wasser schwach erwärmt, die überstehende Lösung abgegossen, mit dem halben Vol. 96%igem mit Benzin vergälltem Alkohol versetzt und unter Rühren tropfenweise 20 vol%ige Schwefelsäure zugegeben. Ein Überschuß mußte vermieden werden, da er den Niederschlag schmierig machte und wieder löste. Die Extraktion des Clupeinpikrates wurde so lange wiederholt, bis nur ein kleiner, schmutziggrauer Rest übrigblieb. Die Niederschläge wurden mit absolutem Alkohol versetzt und in einer Reibschale mehrmals mit absolutem Alkohol gut zerrieben. Hierauf wurde mit Äther gewaschen und im Exsiccator getrocknet.

5. Reinigung des rohen Clupeinsulfates.

Das so gewonnene rohe Clupeinsulfat wurde bei 37° in der eben nötigen Menge Wasser gelöst und 24 Stunden im Eisschrank belassen. Das ausgefallene Öl wurde noch dreimal umgefällt. Die Mutterlaugen wurden vereinigt und mit Alkohol gefällt, danach aus Wasser umgeschieden. Die Öle wurden vereinigt und durch Zusatz von Alkohol zu ihrer wässrigen Lösung ausgefällt. Durch Zusatz von 2 — 3 Tropfen 20%iger Schwefelsäure konnte erreicht werden, daß der Niederschlag flockiger wurde und sich besser absetzte. Er wurde mit absolutem Alkohol mehrmals zerrieben, mit Äther gewaschen und im Exsiccator getrocknet.

Ausbeute: 62% des Roh-Clupeinsulfates.

Analyse: Gesamt - N = 22,74 %,
Amino - N = 0,222%.

II. Überführung des Clupein C-Methylesterhydrochlorids in Clupeinsulfat.

20,0 g Clupein C - Methylesterhydrochlorid wurden in 150 ccm Wasser gelöst und mit 100 ccm n/10 NaOH 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, in einem 1 Liter - Kolben mit 450 ccm 96%igem mit Benzin vergälltem Alkohol versetzt und unter Rühren 20vol%ige Schwefelsäure eingetropft, bis kein weiterer Niederschlag mehr entstand. Nach einigem Stehen im Eisschrank wurde vom Niederschlag abgegossen. Dieser wurde in der eben nötigen Menge Wasser bei 37° gelöst und durch 24stündiges Stehen im Eisschrank ausgefällt. Diese Fällung wurde noch dreimal wiederholt und die wässrige Lösung des abgeschiedenen Öles mit Methanol zu 80% gefällt. Der Niederschlag wurde mit Methanol und Äther gewaschen und im Exsiccator getrocknet.

Ausbeute: 10 g.

Analyse: Gesamt - N = 22,06%,
Amino - N = 0,218%.

III. Darstellung der Fermentpräparate.

1. Darstellung von Darmschleimhaut-Trockenpulver.

3000 g Darmschleimhaut wurden mit 10 Liter Aceton gut durchgeschüttelt und nach zweistündigem Stehen abgesaugt. Der Rückstand

wurde nochmals mit derselben Menge Aceton und dann mit der gleichen Menge Acetonäther (1 : 1) behandelt. Danach wurde zweimal mit 10 Liter Äther gewaschen und zwischen Filtrierpapier im Faust-Heimschen Trockenapparat 5 Stunden bei 37° getrocknet.

Ausbeute: 520 g.

Das trockene farblose Präparat wurde gesiebt, nur das sehr feine weiße Pulver wurde zur Darstellung von Enterokinase verwendet.

Ausbeute: 220 g.

2. Darstellung von Enterokinase.

100 g Darmschleimhaut-Trockenpulver wurden mit 5 Liter 87%-igem Glycerin 4 Stunden geschüttelt und hierauf 40 Stunden im Brutschrank bei 30° aufbewahrt. Wiederum wurde 4 Stunden geschüttelt und dann abzentrifugiert. Der Extraktionsrückstand wurde mit 1 Liter 20%igem Glycerin digeriert und wieder zentrifugiert. Der Rückstand wurde in einer Flasche 3 Stunden mit 5 Liter 0,05 n Ammoniak geschüttelt. Nun wurde abzentrifugiert und das Ammoniak, durch Eindampfen der Lösung im Vacuum bei 35° auf die Hälfte, entfernt. Zu diesen 2500 ccm Darmschleimhaut-Extrakt wurden 175 ccm n Essigsäure gegeben und gut durchgeschüttelt, 2 Stunden im Eisschrank aufbewahrt und von nur noch geringen Mengen ausgefallenen Erepsins durch Zentrifugieren befreit. Die klare Lösung wurde mit einem Drittel ihres Volumens an Äther versetzt und Aceton bis zur Phasengleichheit zugegeben, hierauf einige Stunden im Eisschrank aufbewahrt. Dann wurde abzentrifugiert und der Niederschlag zweimal mit Aceton, Aceton-Äther und zweimal mit Äther nachgewaschen, im Exsiccator über Chlorcalcium im Vacuum getrocknet.

Ausbeute: 2,59 g.

3. Darstellung von Pankreas-Trockenpulver.

5000 g Pankreasdrüsen von Schweinen wurden sofort nach der Schlachtung kurze Zeit mit Wasser gespült, von Fett, Haut und Fleischteilen befreit und fünfmal durch eine Fleischhackmaschine getrieben. Sowohl die Maschine als auch die Drüsen wurden dauernd unter Aceton gehalten. Der erhaltene Brei wurde mit 10 Liter Aceton gut durchgeschüttelt und nach zweistündigem Stehen abgesaugt. Der Rückstand wurde wiederum mit 10 Liter Aceton eine halbe Stunde extrahiert. Diese Extraktion wurde noch einmal mit einer Mischung von 5 Liter Aceton und 5 Liter Äther und hierauf zweimal mit 10 Liter Äther wiederholt. Der Rückstand wurde zwischen Fil-

trierpapier im Faust - Heimschen Trockenapparat bei 37° 5 Stunden getrocknet.

Ausbeute: 550 g.

Der Rückstand wurde im Mörser zerrieben und durch ein engmaschiges Netz abgesiebt.

Ausbeute: 250 g.

4. Darstellung einheitlicher Protaminase.

250 g Pankreas-Trockenpulver wurden mit 200 ccm Glycerin geschüttelt und über Nacht im Brutschrank bei 37° belassen, am nächsten Morgen wiederum 2 Stunden geschüttelt, mit 200 ccm Wasser versetzt und sofort zentrifugiert. Hierauf wurden unter Eiskühlung 35 ccm n - Acetatpuffer ($p_H = 3{,}8$) zugegeben und fünfmal mit je 35 ccm Tonerde $C\gamma$ (= je 700 mg Al_2O_3) versetzt. Die Tonerdesuspension wurde zugegeben, ein paarmal durchgeschüttelt, in Eiswasser auf + 4° abgekühlt und 10 Minuten zentrifugiert. Die Adsorptionsrestlösung wurde sofort mit n/10 NaOH neutralisiert und weiterhin achtmal mit derselben Tonerde (je 35 ccm) behandelt. Es wurden 820 ccm der gereinigten Fermentlösung erhalten.

5. Darstellung von reinem Trypsin.

100 g Pankreas-Trockenpulver wurden mit 1 Liter 87%igem Glycerin 4 Stunden auf der Schüttelmaschine geschüttelt, dann über Nacht im Brutschrank bei 37° stehengelassen und am nächsten Tag wiederum 4 Stunden geschüttelt. Die überstehende Lösung wurde mit 1 Liter Wasser versetzt und zentrifugiert, hierauf in einen Erlenmeyer abgegossen und auf + 4° abgekühlt. Nun wurden 100,0 ccm n - Acetatpuffer von $p_H = 3{,}8$ zugegeben und fünfmal mit je 100,0 ccm Tonerdesuspension $C\gamma$ (je 2000 mg Al_2O_3) behandelt. Zwischen jedem Zentrifugieren wurde wieder auf + 4° abgekühlt. Die Adsorptionsmutterlauge wurde sofort mit n NaOH neutralisiert ($p_H = 7{,}0$) und fünfmal mit je 100 ccm und weiterhin neunmal mit je 150 ccm Tonerde A (100 ccm = 2,95 g Al_2O_3) behandelt.

Die Lösung wurde mit Äther versetzt und Aceton bis zur Phasengleichheit zugegeben, 2 Stunden im Eisschrank aufbewahrt und vom ausgefallenen Ferment abzentrifugiert. Das Ferment wurde noch zweimal mit Äther gewaschen und im Vacuumexsiccator über Chlorcalcium getrocknet.

Ausbeute: 3,82 g.

IV. Darstellung der Tonerden.

1. Darstellung von Tonerde Cγ.

Für die Darstellung ist Ammoniak-Alaun $(NH_4)_2SO_4 \cdot Al_2(SO_4)_3 \cdot 24H_2O$ wegen des konstanten Wassergehaltes und der größeren Reinheit vorzuziehen. Das Ammoniak wurde zu jedem Versuch genau abgemessen und titrimetrisch bestimmt, um darauf die Menge des Alauns genau einzustellen.

500 ccm 10%iges Ammoniak wurden in 3 Liter Wasser von 63°, das 110 g Ammonsulfat enthielt, eingegossen und rasch auf 58° gebracht. Dazu wurden unter starkem Rühren auf einmal 750 ccm einer 58° warmen Lösung von 383,5 g Ammoniakalaun gegeben, wobei die Temperatur auf 61° stieg. Es wurde noch eine Viertelstunde bei etwa 60° gerührt, hierauf im Dekantiertopf auf 20—25 Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt und dekantiert. Der Niederschlag setzte sich zunächst rasch und klar, aber in ziemlich hoher Schicht ab. Um noch vorhandenes oder während des Auswaschens aus Ammoniumsulfat zurückgebildetes basisches Sulfat vollends zu zerlegen, wurden zum Waschwasser beim 4. Dekantieren 80 ccm 20%iges Ammoniak hinzugegeben. Nach dem 12. Auswaschen wurde die Waschflüssigkeit nicht mehr klar. Es wurde trotzdem noch zweimal dekantiert, wofür einige Tage erforderlich waren.

Aussehen: schwach gelbstichiges, ziemlich plastisches Gel.

1%ige HCl	kalt in einigen Stunden, warm rasch und klar löslich.
35%ige HCl	kalt in wenigen Minuten, warm sofort löslich.
12%ige CH_3COOH	in der Wärme in 10 Minuten gelöst.
0,1%ige NaOH	beim Kochen klar löslich.

2. Darstellung von Tonerde A.

250 g $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18\,H_2O$ wurden in 750 ccm Wasser auf 55° erwärmt und die Lösung unter stärkstem Rühren in 2,5 Liter auf 55° erwärmtes 15%iges Ammoniak eingetragen. Die Temperatur stieg auf 58° und wurde unter dauerndem, kräftigem Rühren eine halbe Stunde bei 55—60° gehalten. Dann wurde die Mischung in einen 5-Liter-Rundkolben mit Schliffkühler umgefüllt und 48 Stunden in gelindem Sieden gehalten. Danach wurde die Suspension im Dekantiertopf auf 12 Liter verdünnt und beim Auswaschen vor dem 4. Dekantieren mit 1,5 Liter 15%igem Ammoniak verrührt. Das Auswaschen wurde beendet, nachdem die Waschflüssigkeit dreimal hintereinander trüb geblieben war.

Aussehen: Gel, gelblich mit Stich in grau-rot.
1% HCl auch in der Wärme nicht merklich verändert.
35% HCl in der Wärme erst in 2 Stunden gelöst.
12% CH_3COOH in der Wärme sofort peptisiert.
0,1% NaOH nicht merklich löslich.

V. Prüfung der Fermente auf Dipeptidase- und Carboxy-Polypeptidase-Freiheit.

Gebrauchte Lösungen:

1. 42,5 ccm 25% NH_3, Aqu. dest. ad 250 = 2,5 n Ammoniak.
2. 25,0 ccm 2,5 n NH_3, Aqu. dest. ad 250 = 0,25 n Ammoniak.
3. 4,54 g prim. K - Phosphat, Aqu. dest. ad 100 = m/3.
4. 5,35 g Ammoniumchlorid, Aqu. dest. ad 100.
5. 5,94 g sec. Na - Phosphat, Aqu. dest. ad 100 = m/3.
6. 6,10 ccm Lsg. 5 + 3,9 ccm Lsg. 3 = n - Puffer p_H = 7,0.
7. 1,88 g Leucylglycin wurden in etwa 18 ccm Wasser in einem 50 ccm - Meßkolben mit 2,50 ccm 2,5 n Ammoniak versetzt und unter Umschütteln und Erwärmen zur Lösung gebracht. Dazu wurden 8,30 ccm Lösung 3 (p_H = 7,8) gegeben und auf 50 ccm aufgefüllt.
8. 612,0 mg Leucylglycylglycin wurden mit 0,96 ccm 0,25 n Ammoniak, 1 ccm n NH_4Cl und 2,50 ccm Lösung 6 versetzt und auf 10 ccm aufgefüllt.
9. 20 mg Trypsin wurden in 10 ccm Wasser gelöst.
10. 20 mg Enterokinase wurden in 10 ccm Wasser gelöst.

Verdauungsansätze:

Die Verdauungsansätze wurden 5½ Stunden bei 37° im Thermostaten belassen und die Verdauung mit der Titration nach Willstätter verfolgt.

a) 6 ccm Lösg. 7. im Meßkolben von 10 ccm + 4 ccm Lösg. 9.

Verbrauch an n/100 NaOH	vor:	2,85 ccm	2,84 ccm
	nach:	2,87 ccm	2,84 ccm

b) 6 ccm Lösg. 7. im Meßkolben von 10 ccm + 4 ccm Lösg. 10.

Verbrauch an n/100 NaOH	vor:	2,93 ccm	2,95 ccm
	nach:	2,92 ccm	2,96 ccm

c) 4 ccm Lösg. 8. im Meßkolben von 10 ccm + 6 ccm Lösg. 9.

Verbrauch an n/100 NaOH vor: 3,34 ccm 3,38 ccm
nach: 3,35 ccm 3,385 ccm

d) 4 ccm Lösg. 8. im Meßkolben von 10 ccm + 6 ccm Lösg. 10.

Verbrauch an n/100 NaOH vor: 3,37 ccm 3,46 ccm
nach: 3,39 ccm 3,44 ccm

Alle Lösungen wurden getrennt auf 37° erwärmt und unmittelbar nach dem Zusammengeben titriert.

Es zeigt sich dabei also, daß sowohl das Trypsin als auch die Enterokinase praktisch frei sowohl von Dipeptidase als auch von Polypeptidase ist.

VI. Verdauung des Clupein C-Methylesterhydrochlorids mit Protaminase.

5,0171 g Clupein C - Methylesterhydrochlorid wurden in 80 ccm Wasser gelöst und mit 17 ccm n/10 NaOH zu $p_H = 8{,}0$ versetzt und 150 ccm gereinigte Protaminaselösung zugegeben, dann auf 2250,0 ccm aufgefüllt. Der Kolben wurde im Wasserbad auf 37° erhitzt. Die Verdauung wird durch folgende Tabelle wiedergegeben:

t	T	V
13^{30}	24,0°	0,570
14^{00}	36,0°	1,440
14^{30}	36,0°	1,865
15^{00}	38,0°	2,390
15^{30}	36,0°	2,550
15^{45}	35,5°	2,660
16^{30}	35,0°	2,990
17^{30}	35,5°	3,260
18^{30}	36,5°	3,660
19^{30}	36,0°	3,665

Hierin bedeuten:

t = Zeit
T = Temperatur
V = Verbrauch an n/50 NaOH für 5 ccm Lösung

Die Verdauung wurde mit der Formoltitration verfolgt und schritt nach Zusatz von weiterer Protaminaselösung nicht weiter fort. Als Endwert wurde ein Verbrauch von 3,095 ccm n/50 NaOH für 5 ccm Lösung ermittelt. Waldschmidt - Leitz gibt ganz entsprechend durch Bestimmung des Stickstoffs nach van Slyke 3,250 ccm an. Dies entspricht dem Freiwerden von 10,832 mg Arginin.

Nach beendeter Enzymeinwirkung wurde eine Stunde im siedenden Wasser erhitzt und nach dem Abkühlen vom ausgeschiedenen

Albumin abgetrennt, mit der vierfachen Menge Aceton und derselben Menge Äther versetzt, dann im Eisschrank über Nacht stehen gelassen, am nächsten Morgen von dem öligen Niederschlag abgetrennt und das Filtrat eingeengt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit Tierkohle entfärbt. Mit Salzsäure wurde auf ein p_H von 3 — 4 gebracht und mit gesättigter Flaviansäurelösung versetzt. Hierbei fiel sofort ein schöner kristallisierter Niederschlag von Argininflavianat aus. Das Öl wurde mit absolutem Methanol schwach erwärmt und von einem geringen Niederschlag abfiltriert. Die methanolische Lösung wurde mit der zehnfachen Menge Äther versetzt und das ausgefallene weiße Pulver abgenutscht, mit Äther gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 3,1321 g.

Analyse: Gesamt - N = 23,45%,
Amino - N = 0,278%.

Ausbeute an Argininflavianat: 737,4 mg.

VII. Verdauung von Clupein C-Methylesterhydrochlorid mit reinem Trypsin.

100 g Clupein C - Methylesterhydrochlorid wurden in 4 Liter destilliertem, kohlensäurefreiem Wasser gelöst und auf ein p_H = 8,0 gebracht. Nach zweistündigem Stehen wurde von einer geringen Ausflockung abfiltriert. 200 mg Trypsin wurden in 500 ccm Wasser gelöst und mit 100 mg Enterokinase aktiviert, eine halbe Stunde im Thermostaten bei 35° belassen und mit n/10 NaOH auf ein p_H = 8,0 gebracht. Beide Lösungen wurden vereinigt und auf 5000 ccm aufgefüllt. Es wurden sofort 5,0 ccm entnommen und titriert. Die Verdauung wird durch folgende Tabelle wiedergegeben:

t	V_1	V_2
0′	—0,30	—,—
10′	1,35	1,65
15′	3,23	3,53
30′	7,25	7,55
60′	10,08	10,38
90′	12,00	12,30
120′	12,10	12,40

Hierin bedeuten:
t = Zeit in Minuten
V = Verbrauch an n/50 NaOH für 5 ccm Lösung.

Die Verdauung wurde mit der Formoltitration verfolgt. Sie hatte nach 1½ Stunden ihren Endpunkt erreicht und schritt nach Zusatz von weiteren 50 mg aktivierten Trypsins nicht weiter fort. Das Re-

aktionsgemisch wurde eine Stunde auf 75° erhitzt und nach dem Abkühlen filtriert, hierauf wieder auf 40° erwärmt und mit fester Pikrinsäure, nach Zugabe von HCl zu einem $p_H = 3-4$, versetzt, bis sich ein kleiner Teil nicht mehr löste. Hierauf wurde 12 Stunden stehen gelassen. Von dem ausgeschiedenen Pikrat wurde abgegossen und das Pikrat noch dreimal, insgesamt mit 15 Liter Wasser, ausgezogen. Es wurde jedesmal auf 40° erwärmt und nach 12stündigem Stehen vom Rückstand abgegossen. Das Pikrat wurde allmählich schmieriger. Es wurde in Methylalkohol aufgenommen, von geringem Rückstand abfiltriert, und unter starkem Rühren in die zehnfache Menge getrockneten Äthers langsam einfließen lassen. Nach dieser Methode wurde ein hellgelbes lockeres Pulver erhalten, welches abgenutscht, mit Äther gewaschen und im Vacuumexsiccator über Chlorcalcium getrocknet wurde.

Ausbeute: 96 g.

5 g dieses Pikrats wurden in 50 ccm absoluten Methanols gelöst und getrocknetes Salzsäuregas bei 0° bis + 2° bis zur Sättigung eingeleitet. Es wurde eine halbe Stunde stehen gelassen und in 500 ccm mit Salzsäuregas gesättigten und getrockneten Äther unter gutem Rühren einlaufen lassen. Vom Niederschlag wurde abgetrennt und die Fällung wiederholt. So wurde ein vollkommen farbloses lockeres Pulver erhalten.

Ausbeute: 1,84 g.

Dieses Pulver wurde in 100,0 ccm Wasser gelöst und analysiert.
Gesamt - N = 434,35 mg = 23,5%
Amino - N = 33,6 mg = 7,7% vom Gesamt - N
Q = 13.

30 ccm der Lösung wurden mit 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure 20 Stunden zum Sieden erhitzt und nach dem Erkalten mit Wasser auf etwa 300 ccm verdünnt, mit gesättigter Barytlösung bis zur schwach sauren Reaktion versetzt und vom ausgefallenen Bariumsulfat abgenutscht. Das Filtrat im Vacuum eingeengt und auf 50 ccm aufgefüllt.

Analyse: Gesamt - N = 101,99 mg
Amino - N = 25,2 mg = 25% vom Gesamt - N
Arginin = 277,97 mg = 87,7% vom Gesamt - N.

Die vom Pikrat abgegossene Flüssigkeit wurde im Vaccum auf etwa 3 Liter eingeengt und dreimal 24 Stunden ausgeäthert. Der Äther wurde abgedampft und die wässrige Lösung mit Tierkohle aufgekocht. Nach dem Erkalten wurde mit einer kalt gesättigten

Flaviansäurelösung versetzt, bis kein weiterer Niederschlag mehr entstand. Dieser Niederschlag wurde nach 24stündigem Stehen abfiltriert, mit etwa 3 Liter Wasser nahe zum Sieden erhitzt und rasch unter der Wasserleitung auf 35° abgekühlt, dann abfiltriert und zur Kristallisation stehen gelassen. Bereits am nächsten Morgen hatte sich ein flockiger, sehr voluminöser Niederschlag ausgeschieden, welcher mikroskopisch betrachtet, sich als vollkommen einheitlich erwies und büschelförmige Kristalle darstellte. Von diesen Kristallen wurde abgesaugt und der bei der ersten Extraktion nicht vollständig gelöste Niederschlag mehrmals mit Wasser behandelt. Fast der gesamte Niederschlag konnte auf diese Weise in die kristallinische Fraktion übergeführt werden. Der schmierige, sehr geringe Rückstand wurde verworfen. Ein kleiner Teil der Kristalle wurde auf einem Stückchen Ton getrocknet und der Schmelzpunkt genommen. Die Kristalle zersetzten sich sehr scharf bei 228°. Alle vereinigten, noch feuchten Kristalle wurden mit festem gepulvertem Baryt und Wasser in der Reibschale zerrieben, gut mit Wasser nachgewaschen und sofort Kohlensäure eingeleitet, dann vom ausgeschiedenen Bariumkarbonat abgesaugt, der Rest des Bariums mit verdünnter Schwefelsäure gefällt, eingeengt und auf 250 ccm aufgefüllt.

Analyse: Gesamt - N = 1,332 g
Amino - N = 168 mg = 12,61% vom Gesamt - N
Q = 7,9.

15 ccm wurden hydrolysiert:

Analyse: Gesamt - N = 12,116 mg
Amino - N = 3,080 mg = 25,3% vom Gesamt - N
Arginin = 37,27 mg = 99,0% vom Gesamt - N
Q = 3,9.

Der kristallinische Niederschlag erweist sich also als Arginyl-Arginin-Diflavianat. Zur weiteren Identifizierung wird er in das Dipikrat übergeführt. $^1/_{300}$ Mol Arginyl-Arginin = 70 ccm der Lösung werden mit $^1/_{300}$ Mol + 10% = 1,85 g Pikrinsäure versetzt und schwach erwärmt, bis die Pikrinsäure in Lösung gegangen ist und dann zur Kristallisation bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach einigen Tagen schied sich ein voluminöser Niederschlag aus, der mikroskopisch betrachtet aus lauter feinen, an der Spitze abgeflachten Nädelchen besteht.

Beim Erhitzen sintert dieser Niederschlag bei 180°. Er zersetzt sich das 1. Mal bei 185°, ohne sich wesentlich zu verfärben. Bei weiterem Erhitzen zersetzt er sich ein 2. Mal bei 275° und wird vollkommen schwarz. Beim Erhitzen mit der gleichen Menge Arginin-

pikrat tritt eine Sinterung bereits bei 130° ein. Beim Erhitzen mit aus der Säurehydrolyse erhaltenem Arginyl-Arginin-Dipikrat ist eine derartige Depression nicht zu beobachten.

Die bei der Umkristallisation von Arginyl-Arginin-Diflavianat entstandenen Mutterlaugen werden vereinigt, mit Bariumhydroxyd zerlegt, das Barium entfernt und eingeengt. Hierbei schieden sich ziemliche Mengen von Kochsalz aus, so daß, nachdem der Rückstand mehrmals mit absolutem Methanol aufgenommen und dieses wieder abdestilliert war, der Rückstand wiederum in absolutem Methanol aufgeschlämmt und Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet wurde. Nach kurzem Aufbewahren wurde vom ungelösten Kochsalz abfiltriert und die Lösung eingeengt. Nachdem mehrmals in Wasser aufgenommen und dieses wieder abdestilliert war, wurde der Rückstand in 250 ccm Wasser aufgenommen.

Analyse: Gesamt - N = 542,3 mg
Amino - N = 68,6 mg = 12,6% vom Gesamt - N
Q = 7,9.

50 ccm der Lösung wurden hydrolysiert.

Analyse: Gesamt - N = 106,4 mg
Amino - N = 25,3 mg = 25,00% vom Gesamt - N
Arginin = 263.17 mg = 84.71% vom Gesamt - N
Q = 4,2.

Der Rückstand erweist sich also ebenfalls zum größten Teil als Arginyl-Arginin.

VIII. Verdauung von gereinigtem Clupeinsulfat mit Protaminase.

65 g Clupeinsulfat wurden in 1400 ccm Wasser gelöst und 35 ccm n NaOH zugegeben ($p_H = 8,5$). Von geringer Trübung wurde abfiltriert und weitere 425 ccm Wasser und 1400 ccm gereinigte, mit Albumin versetzte Protaminaselösung zugegeben, sofort 5 ccm abpipettiert und titriert, im Brutschrank stehen gelassen und weitere Proben zu je 5 ccm entnommen.

t	T	V	N
15^{45}	20,0°	0,976	0,270 mg
16^{15}	37,0°	3,295	0,925 mg
16^{45}	36,9°	3,850	1,080 mg
17^{15}	37,0°	3,900	1,098 mg
17^{45}	37,0°	3,950	1,110 mg
18^{45}	36,9°	3,950	1,110 mg

Zunahme: 0,8344 mg Amino - N.

Die Zunahme an Amino-N wurde mit der Formoltitration bestimmt. Es wurde mit n/50 NaOH unter Zusatz von Formaldehyd bis zur deutlichen Phenolphtaleïn-Rötung titriert. Nach beendeter Verdauung wurde eine Stunde auf dem siedenden Wasserbad erhitzt und nach dem Erkalten filtriert, mit Methanol zu 80% gefällt und dekantiert, der Rest abgenutscht. Die Fällung wurde noch zweimal wiederholt und das Clupean aus konzentriert wässriger Lösung umgefällt, wiederum mit Methanol gefällt, mit Methanol und Äther gewaschen und getrocknet. — Hygroskopisches weißes Pulver.

Analyse: Gesamt-N = 22,13%, Amino-N = 0,230%.

IX. Verdauung von Clupeansulfat mit reinem Trypsin.

38 g Clupeansulfat wurden in 1700 ccm Wasser gelöst, dazu eine Lösung von 150 mg Trypsin und 75 mg Enterokinase in 200 ccm Wasser. Das p_H beider Lösungen wurde vorher auf 8,0 eingestellt und unmittelbar nach dem Zusammengeben 5 ccm entnommen und titriert. Die Verdauung wird durch die folgende Tabelle wiedergegeben:

t	V_1	V_2	
—	0,07	—	Hierin bedeuten:
15′	0,37	0,30	
45′	0,77	0,70	t = Zeit
150′	1,57	1,50	V = Verbrauch
4 Std.	2,57	2,50	an n/10 NaOH.
10 Std.	2,65	2,58	

Die Verdauung wurde mit der Formoltitration verfolgt. Sie war nach 4 Stunden beendet und ein weiterer Zusatz von Fermentlösung bewirkte kein weiteres Fortschreiten der Verdauung. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde auf 75° erhitzt und nach dem Abkühlen filtriert, hierauf auf 40° erhitzt und mit fester Pikrinsäure, nach Zugabe von Schwefelsäure zu einem $p_H = 3-4$, versetzt, bis sich ein kleiner Teil nicht mehr löste. Hierauf wurde 12 Stunden stehen gelassen. Vom ausgeschiedenen Pikrat wurde abgegossen und das Pikrat noch dreimal mit insgesamt 10 Liter Wasser bei 40° ausgezogen. Nach 12stündigem Stehen wurde vom ungelösten Rückstand abgegossen. Auch diesmal wurde das Pikrat schmieriger. Es wurde in Methylalkohol bei 35° aufgenommen und von einer geringen, schwarzen Schmiere abgetrennt. Die methylalkoholische Lösung

wurde unter starkem Rühren in die zehnfache Menge trockenen Äther einfließen lassen. Es fiel ein hellgelbes lockeres Pulver aus, welches abgenutscht, mit Äther gewaschen und im Vacuumexsiccator über Chlorcalcium getrocknet wurde.

Ausbeute: 32 g.

5 g dieses Pulvers wurden in 50 ccm absoluten Methanols gelöst und in der Kälte Salzsauregas bis zur Sättigung eingeleitet. Es wurde 30 Minuten stehen gelassen und in 500 ccm mit Salzsäuregas gesättigten Äther einlaufen lassen. Der Niederschlag wurde abgetrennt und die Fällung wiederholt. So wurde ein vollkommen weißes Pulver erhalten.

Ausbeute: 1,92 g.

Dieses Pulver wurde in 100 ccm Wasser gelöst und analysiert.

Gesamt-N = 441,35 mg
Amino-N = 32,20 mg = 7,25% vom Gesamt-N
Q = 14.

15 ccm dieser Lösung wurden hydrolysiert und analysiert.

Gesamt-N = 120,30 mg
Amino-N = 29,26 mg = 24,3% vom Gesamt-N
Arginin = 400,82 mg = 80,4% vom Gesamt-N
Q = 4,14.

Die vom Pikrat abgegossene Flüssigkeit wurde im Vacuum auf etwa 2 Liter eingeengt und dreimal 24 Stunden ausgeäthert. Der Äther wurde aus der Flüssigkeit durch Erhitzen vertrieben und die wässrige Lösung mit Tierkohle aufgekocht. Nach dem Erkalten wurde mit einer kalt gesättigten Flavianlösung versetzt, bis kein weiterer Niederschlag mehr entstand. Der Niederschlag wurde beim Stehen über Nacht kristallin. Er wurde einmal aus heißem Wasser umkristallisiert und zeigte die typische Kristallform des Argininflavianates. Er wurde abgesaugt und ein kleiner Teil auf Ton getrocknet. Die Kristalle wurden mit Bariumhydroxyd zerlegt, mit Tierkohle behandelt und in 250 ccm Wasser gelöst.

Analyse: Gesamt-N = 1,150 g
Amino-N = 288,700 mg = 25,0% vom Gesamt-N
Arginin = 3,614 g = 101,2% vom Gesamt-N
Q = 3,99.

Die Mutterlaugen wurden vereinigt und mit Bariumhydroxyd zerlegt, in 100 ccm Wasser aufgenommen und analysiert.

Gesamt-N = 194,60 mg
Amino-N = 39,03 mg = 20,9% vom Gesamt-N
Q = 4,8.

15 ccm wurden hydrolysiert.

Gesamt - N = 23,25 mg
Amino - N = 5,54 mg = 23,8% vom Gesamt - N
Arginin = 37,32 mg = 50,0% vom Gesamt - N
Q = 4,2.

Zusammenfassung.

1. Clupein C - Methylesterhydrochlorid wurde in Clupeinsulfat überführt.
2. Enterokinase wurde nach einer neuen Methode gereinigt.
3. Clupein C - Methylesterhydrochlorid wurde mit Protaminase verdaut.
4. Clupein C - Methylesterhydrochlorid wurde mit Trypsin verdaut.
5. Arginyl-Arginin wurde nach einer neuen, einfachen und quantitativen Methode aus dem tryptischen Verdauungsgemisch von Clupein C - Methylesterhydrochlorid isoliert.
6. Clupeansulfat wurde mit Trypsin verdaut und nach einer neuen Methode Arginin als Spaltprodukt isoliert.

Auch an dieser Stelle möchte ich meinem hochverehrten Lehrer für die Überlassung dieser Arbeit sowie für die vielseitigen Anregungen und die liebenswürdige Unterstützung bei ihrer Ausführung meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Literatur.

1. A. Kossel: Z. f. physiol. Chem. 88, 163 (1913).
2. K. Felix u. K. Dirr: Z. f. physiol. Chem. 184, 111 (1929).
3. E. Waldschmidt-Leitz, F. Ziegler, A. Schäfer und L. Weil: Z. f. physiol. Chem. 197, 220 (1931).
4. H. Schuberth: Dissertation Frankfurt/Main 1936.
5. K. Felix u. A. Mager: Z. f. physiol. Chem. 249, 112 (1937).
6. A. Kossel: Z. f. physiol. Chem. 23, 406 (1896).
7. K. Felix, K. Inouye u. K. Dirr: Z. f. physiol. Chem. 211, 187 (1932).
8. K. Felix u. K. Dirr: Z. f. physiol. Chem. 209, 5 (1929).
9. K. Felix, K. Dirr u. R. Hirohata: Z. f. physiol. Chem. 218, 296 (1933).
10. E. Rasmussen u. K. Linderström-Lang: Z. f. physiol. Chem. 224, 97; 227, 181 (1934).
11. E. Waldschmidt-Leitz u. E. Kofranyi: Z. f. physiol. Chem. 236, 181 (1935).
12. E. Waldschmidt-Leitz: Z. f. physiol. Chem. 228, 224 (1934).

Lebenslauf.

Am 2. Dezember 1912 wurde ich zu Bensheim a. d. B. als Sohn des Kaufmanns Friedrich Dölp geboren. Nach abgelegter Reifeprüfung an der Oberrealschule zu Offenbach am Main im Frühjahr 1930 begann ich, mich dem Studium der Mathematik an der Universität Frankfurt am Main zu widmen. Zwei Semester später fing ich das Chemiestudium an und legte nach siebensemestrigem Studium mein erstes Verbandsexamen ab, und im Dezember 1936 schloß ich mein Studium mit dem zweiten Verbandsexamen ab. Darauf begann ich am Institut für vegetative Physiologie der gleichen Universität unter der Leitung von Professor Dr. Kurt Felix mit der Durchführung meiner Promotionsarbeit.

Vorliegende Arbeit wurde vom 1. Januar 1937 bis Ende Oktober 1938 im Institut für vegetative Physiologie der Johann Wolfgang Goethe - Universität zu Frankfurt am Main auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. Kurt Felix ausgeführt.

Meine bisherigen Lehrer für mein Chemiestudium waren: Professor Dr. R. Schwarz, Professor Dr. W. Jander, Professor Dr. I. v. Braun, Professor Dr. W. Borsche, Professor Dr. G. Hahn, Professor Dr. K. W. Meißner, Geheimrat Professor Dr. Wachsmuth, Professor Dr. Bonhoeffer, Professor Dr. Magnus, Professor Dr. Schuhmacher, Professor Dr. Nacken.